

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 C12N 15/67, 15/82 // C12P 21/00, C12N 5/04	A1	(11) 国際公開番号 WO97/47755 (43) 国際公開日 1997年12月18日(18.12.97)		
<table border="1"><tr><td data-bbox="228 449 841 1041">(21) 国際出願番号 PCT/JP97/02030 (22) 国際出願日 1997年6月12日(12.06.97) (30) 優先権データ 特願平8/172922 1996年6月12日(12.06.96) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 日本たばこ産業株式会社(JAPAN TOBACCO INC.)(JP/JP) 〒105 東京都港区虎ノ門二丁目2番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 植木 潤(Ueki, Jun)(JP/JP) 太田象三(Ohta, Shozo)(JP/JP) 倉屋芳樹(Kuraya, Yoshiki)(JP/JP) 〒438 静岡県磐田郡豊田町東原700 日本たばこ産業株式会社 遺伝育種研究所内 Shizuoka, (JP) 森岡真二(Morioka, Shinji)(JP/JP) 〒105 東京都港区虎ノ門二丁目2番1号 日本たばこ産業株式会社内 Tokyo, (JP)</td><td data-bbox="841 449 1468 1041">(74) 代理人 弁理士 谷川英次郎(TANIGAWA, Hidejiro) 〒102 東京都千代田区飯田橋4丁目5番12号 岩田ビル6階 谷川国際特許事務所 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AU, CA, CN, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書</td></tr></table>			(21) 国際出願番号 PCT/JP97/02030 (22) 国際出願日 1997年6月12日(12.06.97) (30) 優先権データ 特願平8/172922 1996年6月12日(12.06.96) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 日本たばこ産業株式会社(JAPAN TOBACCO INC.)(JP/JP) 〒105 東京都港区虎ノ門二丁目2番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 植木 潤(Ueki, Jun)(JP/JP) 太田象三(Ohta, Shozo)(JP/JP) 倉屋芳樹(Kuraya, Yoshiki)(JP/JP) 〒438 静岡県磐田郡豊田町東原700 日本たばこ産業株式会社 遺伝育種研究所内 Shizuoka, (JP) 森岡真二(Morioka, Shinji)(JP/JP) 〒105 東京都港区虎ノ門二丁目2番1号 日本たばこ産業株式会社内 Tokyo, (JP)	(74) 代理人 弁理士 谷川英次郎(TANIGAWA, Hidejiro) 〒102 東京都千代田区飯田橋4丁目5番12号 岩田ビル6階 谷川国際特許事務所 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AU, CA, CN, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書
(21) 国際出願番号 PCT/JP97/02030 (22) 国際出願日 1997年6月12日(12.06.97) (30) 優先権データ 特願平8/172922 1996年6月12日(12.06.96) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 日本たばこ産業株式会社(JAPAN TOBACCO INC.)(JP/JP) 〒105 東京都港区虎ノ門二丁目2番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 植木 潤(Ueki, Jun)(JP/JP) 太田象三(Ohta, Shozo)(JP/JP) 倉屋芳樹(Kuraya, Yoshiki)(JP/JP) 〒438 静岡県磐田郡豊田町東原700 日本たばこ産業株式会社 遺伝育種研究所内 Shizuoka, (JP) 森岡真二(Morioka, Shinji)(JP/JP) 〒105 東京都港区虎ノ門二丁目2番1号 日本たばこ産業株式会社内 Tokyo, (JP)	(74) 代理人 弁理士 谷川英次郎(TANIGAWA, Hidejiro) 〒102 東京都千代田区飯田橋4丁目5番12号 岩田ビル6階 谷川国際特許事務所 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AU, CA, CN, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書			
(54) Title: METHOD FOR THE EXPRESSION OF FOREIGN GENES AND VECTORS THEREFOR (54) 発明の名称 外来遺伝子の発現方法及びそのためのベクター (57) Abstract A method for the expression of foreign genes enabling the stronger expression of the foreign genes than those achieved by the conventional methods. This method comprises inserting a foreign gene into the downstream of a promoter and expressing the gene in the cell, wherein two or more intron sequences which are the same or different and capable of promoting the expression of the foreign gene have been inserted into the upstream of the foreign gene.				

(57) 要約

従来の方法よりも外来遺伝子を強く発現させることができる、外来遺伝子の発現方法及びそのための組換えベクターが開示されている。本発明の外来遺伝子の発現方法は、プロモーターの下流に外来遺伝子を挿入し、細胞中で該外来遺伝子を発現させるものであって、該外来遺伝子の上流に、外来遺伝子の発現を促進する効果を有する、同一又は異なるイントロン配列を複数挿入して前記外来遺伝子を発現させる。

参考情報

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載されたPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AL	アルバニア	ES	スペイン	LR	リベリア	SG	シンガポール
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LS	レソト	SI	スロヴェニア
AT	オーストリア	FR	フランス	LT	リトアニア	SK	スロヴァキア共和国
AU	オーストラリア	GB	ガボン	LU	ルクセンブルグ	SL	シエラレオネ
AZ	アゼルバイジャン	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GH	ガーナ	MC	モナコ	SZ	スワジランド
BB	バルバドス	GM	ギニア	MD	モルドヴァ共和国	TD	チャード
BE	ベルギー	GN	ギニアビサウ	MG	マダガスカル	TG	タンザニア
BF	ブルキナ・ファソ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア共和国	TJ	タジキスタン
BG	ブルガリア	HU	ハンガリー		ラヴィニア共和国	TM	トルクメニスタン
BJ	ベナン	ID	インドネシア	ML	マリ	TR	トルコ
BR	ブラジル	IE	アイルランド	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
BY	ベラルーシ	IL	イスラエル	MR	モリタニア	UA	ウクライナ
CA	カナダ	IS	アイスランド	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CF	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	MX	メキシコ	US	米国
CG	コンゴ	JP	日本	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CH	スイス	KE	ケニア	NL	オランダ	VN	ヴェトナム
CI	コート・ジボアール	KG	キルギスタン	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CM	カメルーン	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CN	中国	KR	大韓民国	PL	ポーランド		
CU	キューバ	KZ	カザフスタン	PT	ポルトガル		
CZ	チェコ共和国	LC	セントルシア	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	RU	ロシア連邦		
DK	デンマーク	LK	スリランカ	SD	スーダン		
EE	エストニア			SE	スウェーデン		

明細書

外来遺伝子の発現方法及びそのためのベクター

技術分野

5 本発明は、外来遺伝子の発現方法及びそのための組換えベクターに関する。さらに詳細には、本発明は、遺伝子工学的手法により細胞中で外来遺伝子を発現させる際に、該外来遺伝子の発現を従来法よりも促進することができる、外来遺伝子の発現方法及びそのためのベクターに関する。

背景技術

10 外来遺伝子の発現を促進することは、遺伝子工学の手法において、特に遺伝子工学の手法を植物に適用する際に最も必要とされる技術のひとつである。

その方法のひとつとして、外来遺伝子の upstream にイントロン由来 DNA 断片を挿入する方法が知られている。例えば、特開平 3-103182 号公報には、ヒマカターゼ遺伝子 (CAT-1) のイントロン由来 DNA 断片を外来遺伝子の upstream に挿入して該外来遺伝子を発現させることにより、該外来遺伝子の発現が促進
15 されることが記載されている。同様な現象は種々のイントロン由来 DNA 断片について報告されている。

外来遺伝子の発現を促進する目的でイントロンが利用されてきたが、複数イントロンの利用は一般的でなく、その効果も認められていなかった。例えば、トウモロコシのアルコールデヒドロゲナーゼ-1 の第 1 イントロンと第 6 イントロン
20 はそれぞれ単独で遺伝子発現促進効果を示すが、両者を連結した場合の効果は第 6 イントロンの単独使用に及ばない (Mascarenhas et al. Plant Mol. Biol., 15, 913-920 (1990))。また、トウモロコシのアクチンの第 3 イントロンを 2 つ連結した場合にも、その効果は単独使用に及ばない (Luehrsen et al., Mol. Gen. Genet., 225, 81-93 (1991))。

25 イントロン由来の DNA 断片を挿入する従来の方法は有効であるが、発現促進の効果が不十分な場合も多く、より強い発現を可能とする方法が望まれていた。

発明の開示

従って、本発明の目的は、従来の方法よりも外来遺伝子を強く発現させること

ができる、外来遺伝子の発現方法及びそのための組換えベクターを提供することである。

本願発明者らは、鋭意研究の結果、外来遺伝子の上流に挿入された場合に外来遺伝子の発現を促進する効果を有する同一又は異なる複数のイントロン由来DNA断片を外来遺伝子の上流に挿入することにより、イントロン由来DNA断片を1個挿入する従来の方法に比較して顕著に外来遺伝子の発現が高まることを見出し本発明を完成した。

すなわち、本発明は、プロモーターの下流に外来遺伝子を挿入し、細胞中で該外来遺伝子を発現させる外来遺伝子の発現方法において、該外来遺伝子の上流に、外来遺伝子の発現を促進する効果を有する、同一又は異なるイントロン由来DNA断片を複数挿入して前記外来遺伝子を発現させることを特徴とする、外来遺伝子の発現方法を提供する。

また、本発明は、プロモーターと、その下流に挿入された外来遺伝子と、該外来遺伝子の上流に挿入された、外来遺伝子の発現を促進する効果を有する、同一又は異なる複数のイントロン由来DNA断片とを含む組換えベクターを提供する。

本願発明者らは、配列表の配列番号3に示される塩基配列を有する、トウモロコシのユビキチン遺伝子のイントロン配列が単独で外来遺伝子の上流に挿入されている場合であっても該外来遺伝子の発現を促進する効果を有することを見出し、本願第2の発明を完成した。

すなわち、本発明はまた、プロモーターの下流に外来遺伝子を挿入し、細胞中で該外来遺伝子を発現させる外来遺伝子の発現方法において、該外来遺伝子の上流に、配列表の配列番号3で示される配列又はその機能的変異体を挿入して前記外来遺伝子を発現させることを特徴とする、外来遺伝子の発現方法を提供する。

本発明により、外来遺伝子の発現が従来の方法に比べて顕著に促進された外来遺伝子の発現方法及びそのための組換えベクターが提供された。本発明によれば、遺伝子工学的手法により導入した外来遺伝子の発現が促進されるので、本発明は遺伝子工学の分野に大いに寄与するものと期待される。

発明を実施するための最良の形態

本発明の方法は、発現すべき外来遺伝子上流に、外来遺伝子の発現を促進する効果を有するイントロン由来DNA断片を2個以上挿入することにより、外来遺伝子の発現を促進することを特徴とする。

ここで、「外来遺伝子の発現を促進する効果を有するイントロン由来DNA断片」とは、これを挿入せずに外来遺伝子を発現させた場合に比べて、外来遺伝子の発現を検出可能な程度に増加させる効果を有するイントロン由来DNA断片を意味する。このようなイントロン由来DNA断片自体は種々知られており、例えば、ヒマのカタラーゼ遺伝子(CAT-1)の第1イントロン(特開平3-103182号公報、Tanaka et al. Nucleic Acids Res. 18, 6767-6770(1990))、
10 トウモロコシのUDP-グルコース：フラボノールグリコシルトランスフェラーゼのイントロン(Callis et al., Genes & Develop. 1, 1183-1200 (1987))、トウモロコシのアルコールデヒドロゲナーゼ-1第1イントロン(Callis et al., Genes & Develop. 1, 1183-1200 (1987))、トウモロコシのアルコールデヒドロゲナーゼ-1第2及び第6イントロン(Mascarenhas et al., Plant Mol. Biol.
15 15, 913-920(1990))、トウモロコシのシュランケン-1第1イントロン(Vasil et al., Plant Physiol. 91, 1575-1579(1989))、アラビドプシス・サリアナ(Arabidopsis thaliana)の翻訳伸長因子(translation elongation factor) EF-1 α 第1イントロン(Curie et al. Nucleic Acids Res. 19, 1305-1310 (1991))及びイネのアクチンの第1イントロン(McElroy et al. Plant Cell 2, 16
20 3-171(1990))などを挙げることができる。もっとも、本発明に用いることができるイントロン由来DNA断片はこれらに限定されるものではなく、その下流に位置する外来遺伝子の発現を促進できるものであればいずれのものであってもよい。

また、本願発明者らは、先にイネのホスホリパーゼD(PLD)遺伝子のcDNA
25 NAとゲノムDNAの塩基配列を比較することによりイネPLD遺伝子のイントロンを見出し、かつ、これらのイントロンのうちの1つがその下流の遺伝子の発現を顕著に促進する効果を有することを見出し、特許出願した(PCT/JP96/00812)。このイントロンの塩基配列を配列表の配列番号1に示す。本発明では、この配列

番号 1 に示すイントロン由来 DNA 断片を用いることもできる。また、配列表の配列番号 2 に示されるヒマカタラーゼイントロン配列や配列番号 3 に示されるトウモロコシユビキチン遺伝子のイントロン配列も好ましく用いることができる。

5 なお、一般に、生理作用を有する DNA 配列において、1 又は複数のヌクレオチドが付加、挿入、欠失若しくは置換された場合であっても、その生理活性を維持する可能性があることは当業者において広く認められているところである。本発明においては、上記の公知のイントロン由来 DNA 断片及び配列番号 1 に示されるイントロン由来 DNA 断片にこのような修飾が加えられ、かつ下流の遺伝子の発現を促進する作用を有する DNA 断片も、本発明で言う「イントロン由来 DNA 断片」に包含される。すなわち、上記の公知のイントロン由来 DNA 断片及び配列表の配列番号 1 で示されるイントロン由来 DNA 断片において 1 又は複数のヌクレオチドが付加、欠失若しくは置換されておりかつその下流に存在する遺伝子の発現を促進する作用を有する DNA 断片も本発明における「イントロン由来 DNA 断片」に包含される。ここで、このような修飾されたイントロン由来 DNA 断片は、もとのイントロン由来 DNA 断片と 70% 以上、さらに好ましくは 90% 以上の相同性を有することが好ましい。同様に、本願特許請求の範囲に記載されている「機能的変異体」も元の配列において 1 又は複数のヌクレオチドが付加、欠失若しくは置換されておりかつその下流に存在する遺伝子の発現を促進する作用を有する配列であり、元の配列と好ましくは 70% 以上、さらに好ましくは 90% 以上の相同性を有するものである。例えば、「配列番号 1 に示される配列の機能的変異体」とは、配列番号 1 に示される配列の 1 又は複数のヌクレオチドが付加、欠失若しくは置換されておりかつその下流に存在する遺伝子の発現を促進する作用を有する配列であり、元の配列と好ましくは 70% 以上、さらに好ましくは 90% 以上の相同性を有する配列を意味する。

25 上記の各イントロン由来 DNA 断片は、その塩基配列及びその由来が公知であるので、常法である PCR 法により容易に調製することができる。また、長さが 200 bp 程度以下のものならば化学合成することも可能である。また、上記の修飾イントロン由来 DNA 断片も常法である部位特異的変異法又は化学合成法に

より容易に調製することができる。

本発明の方法では、発現すべき外来遺伝子の上流、すなわち該外来遺伝子の転写領域、より好ましくはこの転写領域の5'末端側に上記イントロン由来DNA断片が複数個挿入される。イントロン由来DNA断片はプロモーターと外来遺伝子の間に挿入することが好ましい。上記イントロン由来DNA断片は、発現すべき外来遺伝子の直上流に挿入されていてもよいが、イントロン由来DNA断片と外来遺伝子の間に他の配列が介在していてもよい。この介在する配列の長さは特に限定されないが、通常0～1000bp程度である。また、プロモーターとイントロン由来DNA断片とは直結していてもよいし、これらの間に他の配列が介在していてもよい。この介在する配列の長さは特に限定されないが、通常0～1000bp程度である。

本発明の方法では、上記イントロン由来DNA断片を複数個、好ましくは2～5個、さらに好ましくは2又は3個挿入する。挿入するイントロン由来DNA断片は同一の配列であっても異なる配列であってもよい。挿入される複数のイントロン由来DNA断片は、互いに直結されていてもよいし、それらの間に他の配列が介在していてもよい。この介在する配列の長さは特に限定されないが、通常0～1000bp程度である。

なお、プロモーターとしては、下流の外来遺伝子を発現させることができるいずれのプロモーターをも用いることができ、好ましい例として、35Sプロモーターを挙げることができるがこれに限定されるものではない。

本発明は、また、上記本発明の方法を適用した組換えベクターをも提供する。すなわち、本発明は、プロモーターと、その下流に連結された発現すべき外来遺伝子と、該外来遺伝子の上流に挿入された、外来遺伝子の発現を促進する効果を有する、同一又は異なる複数のイントロン由来DNA断片とを含む組換えベクターを提供する。このような組換えベクターは、適当な発現ベクターに上記複数個のイントロン由来DNA断片及び外来遺伝子を挿入することにより得ることができる。この挿入は、発現ベクターのクローニング部位の塩基配列がわかっているので、適当な制限酵素や必要によりリンカーを用いることにより容易に行なうこ

とができる。

なお、このような発現ベクターは、種々のものがこの分野において周知であり、かつ市販されている。これらの発現ベクターは、宿主細胞内で複製するための複製開始点、プロモーター、外来遺伝子を挿入するための制限酵素部位を与えるクローニング部位及び薬剤耐性遺伝子等の選択マーカーを少なくとも含み、通常、転写を安定に終了させるターミネーターや、宿主が細菌の場合にはSD配列を含む。本発明の方法においては、これらの公知の発現ベクターのいずれをも採用することができる。

本願発明者らは、配列表の配列番号3に示される塩基配列を有する、トウモロコシのユビキチン遺伝子のイントロン配列が単独で外来遺伝子の upstream に挿入されている場合であっても該外来遺伝子の発現を促進する効果を有することを見出した。従って、上記複数のイントロン由来配列に代えて、配列番号3で示される配列又はその機能的誘導体を1つだけ挿入する場合も本発明の範囲に含まれる。もっとも、配列番号3で示される配列であっても複数個挿入する方が効果が大きく、特に、配列番号1で示されるイネPLDのイントロン配列と共に挿入すると効果が大きい。

実施例

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

実施例 1

イネPLDの遺伝子には、mRNAの5'末端非翻訳領域に対応する位置に173bpの第1イントロンが存在する(配列番号1、WO 95/09234)。そのイントロンについて植物細胞における遺伝子発現に及ぼす影響を調べた。エキソン部分を10ベースずつ含む20merのプライマー(5'-TCACCACCCGGTAAGCCCAG-3', 3'-CCCCGCGTCCATCCCGCTC-5')を合成し、イネゲノムクローンを鋳型としてPCRを行った。PCR反応は、50 pmolの各々のプライマーの混合物、200 μMのdATP, dCTP, dGTP および dTTP、1 x PCR 緩衝液(宝酒造社製)および 2.5 U AmpliTaq DNA ポリメラーゼ(宝酒造社製)を使用して全容積 50 μlで行った。

反応は下記の温度条件に従って 30 周期を繰り返した；DNA サーマサイクラー（パーキン エルマー シータス社製）中で：1 分間にわたり 94 °C、1 分間にわたり 40 °C、および 2 分 30 秒間にわたり 72 °C。

5 PCR産物をPCR II ベクター（インビトロジェン社製）にサブクローニングし、そこからEcoRIで切り出した断片を平滑末端処理した後、東洋紡社製のプラスミド pBI221（35S プロモーター（以下、「35S pro」）の下流にβ-グルクロニダーゼ遺伝子（以下、「GUS」）を挿入したベクタープラスミド）のSmaIサイトに組み込んだベクターpBI221P（35S pro, PLD intron, GUS）を調製した。さらに、そのプラスミドをBamHIで消化し、平滑末端処理を行っ
10 たのち、上記の断片を組み込み、ベクターpBI221PP（35S pro, PLD intron x 2, GUS）を作製した。

また、特開平 03-103182 号公報に記載されたpIG221（35S pro の下流にヒマカタラーゼイントロン（配列表の配列番号2）及びGUSをこの順序で有する）をXbaIで消化し、平滑末端処理の後、上記PLDイントロンの配列を有する
15 DNA断片を挿入して、ベクターpIG221P（35S pro, PLD intron, Catalase intron, GUS）を作製した。

日本稲品種のニホンバレの未熟胚よりイネ培養細胞を調製し（Hiei et al. The Plant Journal, 6, 271-282 (1994)）、既報（Shimamoto et al. Nature, 338, 274-276 (1989)）にしたがって上記遺伝子を導入後、β-glucuronidase (GUS)
20 活性を測定した。結果を表1に示す。

表1に示したとおり、2つの同種あるいは異種のイントロンの導入により、単独使用の場合と比べてGUS活性の顕著な増大が認められた。同時に、PLDイントロンの塩基配列を有するDNA断片は、イントロンの塩基配列を有するDNA断片の複数使用において遺伝子発現促進効果を得られるDNA断片であることが明らかになった。
25

表 1

プラスミド	GUS 活性
なし	7.2
pBI221 (35S pro, GUS)	14
pBI221P (35S pro, PLD intron, GUS)	180
pBI221PP (35S pro, PLD intron x 2, GUS)	430
pIG221 (35S pro, Catalase intron, GUS)	160
pIG221P (35S pro, PLD intron, Catalase intron, GUS)	680

実施例 2

トウモロコシのユビキチン遺伝子 (Ubi-1: Christensen A.H. et al. Plant Mo
 5 l. Biol., 18, 675-689 (1982)) のイントロンについても外来遺伝子発現の促進
 効果を調べた。用いたベクターは 2 種類である。

まず、単独使用での効果を調べるためのベクターを以下の方法で作製した。ユ
 ビキチン遺伝子のプロモーターとイントロンの部分を P s t I で切り出し (配列
 番号 3)、pUC18 ベクターの P s t I サイトに挿入した。イントロン部分を B g
 10 I I I と B a m H I で切り出し、pBI221 ベクターの B a m H I サイトに挿入し、
 ベクター pBI221U (35S pro, Ubiquitin intron, GUS) とした。

次に、複数使用での効果を調べるためのベクターを以下の方法で作製した。イ
 ントロン部分を B g I I I と B a m H I で切り出し、平滑末端処理の後、pBI221
 ベクターの S m a I サイトに挿入した。さらに、そのベクターの B a m H I サイ
 15 トに平滑末端処理を行ない、記述の P L D イントロンを挿入することにより、ベ
 クター pBI221PU (35S pro, PLD intron, Ubiquitin intron, GUS) とした。これら
 のベクターを上述の方法でプロトプラストに導入し、G U S 活性を測定した。

表 2 に示した通り、ユビキチンイントロンの単独使用によって G U S 発現の促
 進効果が認められた。さらに、P L D イントロンとユビキチンイントロンの併用
 20 によって、各々のイントロンを単独で使した場合と比べ、より強い促進効果が
 認められた。

表 2

プラスミド	G U S 活性 (pmol MU/min./mg protein)
なし	3.3
pBI221 (35S pro, GUS)	13
pBI221 (35S pro, PLD intron, GUS)	100
pBI221 (35S pro, Ubiquitin intron, GUS)	360
pBI221 (35S pro, PLD intron, Ubiquitin intron, GUS)	780

配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 173

配列の型 : 核酸

5 配列の種類 : Genomic DNA

起源

生物名 : *Oryza sativa*

トポロジー : 直鎖状

鎖の数 : 二本鎖

10 配列

```
GTAAGCCAG TGTGCTTAGG CTAAGCGCAC TAGAGCTTCT TGCTCGCTTG CTTCTTCTCC 60
GCTCAGATCT GCTTGCTTGC TTGCTTCGCT AGAACCCCTAC TCTGTGCTGC GAGTGTGCGT 120
GCTTCGTCTT CCTTCCTCAA GTTCGATCTG ATTGTGTGTG TGGGGGGGCG CAG 173
```

15 配列番号 : 2

配列の長さ : 217

配列の型 : 核酸

配列の種類 : Genomic DNA

起源

20 生物名 : ヒマ

トポロジー : 直鎖状

鎖の数 : 二本鎖

配列

```
ACATGGATCC CTACAGGGTA AATTTCTAGT TTTTCTCCTT CATTTTCTTG GTTAGGACCC 60
TTTTCTCTTT TTATTTTTTT GAGCTTTGAT CTTTCTTTAA ACTGATCTAT TTTTAAATTG 120
ATTGGTTATG GTGTAAATAT TACATAGCTT TAACTGATAA TCTGATTACT TTATTTCTGT 180
TGTCTATGAT GATGATGATA GTTACAGAAC CGTCGAC 217
```

配列番号 : 3

配列の長さ : 1010

配列の型 : 核酸

配列の種類 : Genomic DNA

5 起源

生物名 : トウモロコシ

トポロジー : 直鎖状

鎖の数 : 二本鎖

配列

10	GTACGCCGCT CGTCCTCCCC CCCCCCCCCT CTCTACCTTC TCTAGATCGG CGTTCGGGTC	60
	CATGGTTAGG GCCCGGTAGT TCTACTTCTG TTCATGTTTG TGTTAGATCC GTGTTTGTGT	120
	TAGATCCGTG CTGCTAGCGT TCGTACACGG ATGCGACCTG TACGTCAGAC ACGTTCTGAT	180
	TGCTAACTTG CCAGTGTTTC TCTTTGGGGA ATCCTGGGAT GGCTCTAGCC GTTCCGCAGA	240
	CGGGATCGAT TTCATGATTT TTTTGTGTTT GTTGCATAGG GTTTGGTTTG CCCTTTTCCT	300
15	TTATTTCAAT ATATGCCGTG CACTTGTTTG TCGGGTCATC TTTTCATGCT TTTTTTGTG	360
	TTGGTTGTGA TGATGTGGTC TGGTTGGGCG GTCGTTCTAG ATCGGAGTAG AATTCTGTTT	420
	CAAATACTT GGTGGATTTA TTAATTTTGG ATCTGTATGT GTGTGCCATA CATATTCATA	480
	GTTACGAATT GAAGATGATG GATGGAAATA TCGATCTAGG ATAGGTATAC ATGTTGATGC	540
	GGGTTTTACT GATGCATATA CAGAGATGCT TTTTGTTCGC TTGGTTGTGA TGATGTGGTG	600
20	TGGTTGGGCG GTCGTTTATT CGTTCTAGAT CGGAGTAGAA TACTGTTTCA AACTACCTGG	660
	TGTATTTATT AATTTTGGAA CTGTATGTGT GTGTCATACA TCTTCATAGT TACGAGTTTA	720
	AGATGGATGG AAATATCGAT CTAGGATAGG TATACATGTT GATGTGGGTT TTAGTGATGC	780
	ATATACATGA TGGCATATGC AGCATCTATT CATATGCTCT AACCTTGAGT ACCTATCTAT	840
	TATAATAAAC AAGTATGTTT TATAATTATT TTGATCTTGA TATACTTGA TGATGGCATA	900
25	TGCAGCAGCT ATATGTGGAT TTTTATAGCC CTGCCTTCAT ACGCTATTTA TTTGCTTGGT	960
	ACTGTTTCTT TTGTCGATGC TCACCCTGTT GTTTGGTGT ACTTCTGCAG	1010

請求の範囲

1. プロモーターの下流に外来遺伝子を挿入し、細胞中で該外来遺伝子を発現させる外来遺伝子の発現方法において、該外来遺伝子上流に、外来遺伝子の発現を促進する効果を有する、同一又は異なるイントロン由来DNA断片を複数挿入して前記外来遺伝子を発現させることを特徴とする、外来遺伝子の発現方法。
5
2. 前記複数のイントロン由来DNA断片は、前記プロモーターと前記外来遺伝子の間に挿入される請求項1記載の方法。
3. 前記細胞は植物細胞である請求項1又は2記載の方法。
4. 前記複数のイントロン由来DNA断片のうちの少なくとも1つは配列表の配列番号1で示される配列又はその機能的変異体を含む請求項1ないし3のいずれか1項に記載の方法。
10
5. 前記複数のイントロン由来DNA断片として、配列表の配列番号1で示される配列又はその機能的変異体を2個含む、請求項4記載の方法。
6. 前記複数のイントロン由来DNA断片のうちの少なくとも1つは配列表の配列番号2で示される配列又はその機能的変異体を含む請求項1ないし4のいずれか1項記載の方法。
15
7. 前記複数のイントロン由来DNA断片は、配列表の配列番号1で示される配列又はその機能的変異体と、配列表の配列番号2で示される配列又はその機能的変異体をそれぞれ含む請求項6記載の方法。
8. 前記複数のイントロン由来DNA断片のうちの少なくとも1つは配列表の配列番号3で示される配列又はその機能的変異体を含む請求項1ないし3のいずれか1項に記載の方法。
20
9. 前記複数のイントロン由来DNA断片は、配列表の配列番号1で示される配列又はその機能的変異体と、配列表の配列番号3で示される配列又はその機能的変異体をそれぞれ含む請求項8記載の方法。
25
10. プロモーターと、その下流に連結された発現すべき外来遺伝子と、該外来遺伝子上流に挿入された、外来遺伝子の発現を促進する効果を有する、同一又は異なる複数のイントロン由来DNA断片とを含む組換えベクター。

11. 前記複数のイントロン由来DNA断片は、前記プロモーターと前記外来遺伝子の間に挿入されている請求項10記載の組換えベクター。
12. 植物細胞内で複製可能なものである請求項10又は11記載の組換えベクター。
- 5 13. 前記複数のイントロン由来DNA断片のうちの少なくとも1つは配列表の配列番号1で示される配列又はその機能的変異体を含む請求項10ないし12のいずれか1項に記載の組換えベクター。
14. 前記複数のイントロン由来DNA断片として、配列表の配列番号1で示される配列又はその機能的変異体を2個含む、請求項13記載の組換えベクター。
- 10 15. 前記複数のイントロン由来DNA断片のうちの少なくとも1つは配列表の配列番号2で示される配列又はその機能的変異体を含む請求項10ないし12のいずれか1項記載の組換えベクター。
16. 前記複数のイントロン由来DNA断片は、配列表の配列番号1で示される配列又はその機能的変異体と、配列表の配列番号2で示される配列又はその機能的変異体をそれぞれ含む請求項15記載の組換えベクター。
- 15 17. 前記複数のイントロン由来DNA断片のうちの少なくとも1つは配列表の配列番号3で示される配列又はその機能的変異体を含む請求項10ないし12のいずれか1項記載の組換えベクター。
18. 前記複数のイントロン由来DNA断片は、配列表の配列番号1で示される配列又はその機能的変異体と、配列表の配列番号3で示される配列又はその機能的変異体をそれぞれ含む請求項17記載の組換えベクター。
- 20 19. プロモーターの下流に外来遺伝子を挿入し、細胞中で該外来遺伝子を発現させる外来遺伝子の発現方法において、該外来遺伝子上流に、配列表の配列番号3で示される配列又はその機能的変異体を挿入して前記外来遺伝子を発現させることを特徴とする、外来遺伝子の発現方法。
- 25 20. 前記配列表の配列番号3で示される配列が挿入される請求項19記載の方法。
21. 前記配列表の配列番号3で示される配列又はその機能的変異体は、前記プ

ロモーターと前記外来遺伝子の間に挿入される請求項 1 9 又は 2 0 記載の方法。

2 2 . 前記細胞は植物細胞である請求項 1 9 ないし 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/02030

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. C1⁶ C12N15/67, C12N15/82 // C12P21/00, C12N5/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C1⁶ C12N15/67, C12N15/82, C12P21/00, C12N5/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, BIOSYS, Genetyx

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Plant Molecular Biology, Vol. 15 (1990) D. Mascarenhas et al. "Intron-mediated enhancement of heterologous gene expression in maize" p. 913-920 (Refer to Fig. 1)	1-3, 10-12 4-6, 8, 13-15, 17, 19-22
X Y	Mol. Gen. Genet., Vol. 225 (1991) K.R. Luehrsen et al. "Intron enhancement of gene expression and the splicing efficiency of introns in maize cells" p. 81-93 (Refer to Fig. 1B)	1-3, 10-12 4-6, 8, 13-15, 17, 19-22
X	JP, 06-343476, A (Miles Inc.), December 20, 1994 (20. 12. 94), (Refer to claim 1; Figs. 1, 2) & EP, 629700, A2 & CA, 2125449, A	1-2, 10-11
PY A	WO, 96/30510, A (Japan Tobacco Inc.), October 3, 1996 (30. 10. 96), (Refer to claim 1; Figs. 1, 2) & EP, 769553, A1 & AU, 9651207, A	4-5, 13-14 7, 9, 16, 18
Y	JP, 03-103182, A (Mitsubishi Chemical Corp.),	6, 15



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

September 9, 1997 (09. 09. 97)

Date of mailing of the international search report

September 24, 1997 (24. 09. 97)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/02030

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	April 30, 1991 (30. 04. 91), (Refer to claim) (Family: none)	7, 16
<u>Y</u> A	Plant Molecular Biology, Vol. 18 (1992) A.H. Christensen et al. "Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer photoplasts by electroporation" p. 675-689 (Refer to page 681)	<u>8, 17, 19-22</u> 9, 18

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 97/02030

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12N15/67, C12N15/82//C12P21/00, C12N5/04

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12N15/67, C12N15/82, C12P21/00, C12N5/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, BIOSYS, Genetyx

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	Plant Molecular Biology, Vol. 15(1990) D. Mascarenhas et al. 「Intron-mediated enhancement of heterologous gene expression in maize」 p. 913-920 (第1図参照)	1-3, 10-12 4-6, 8, 13-15, 17, 19-22
X Y	Mol. Gen. Genet., Vol. 225(1991) K. R. Luehrsen et al. 「Intron enhancement of gene expression and the splicing efficiency of introns in maize cells」 p. 81-93 (第1B図参照)	1-3, 10-12 4-6, 8, 13-15, 17, 19-22
X	J P, 06-343476, A (Miles Incorporated) 20. 12月, 1994 (20. 12. 94) (請求項1, 第1, 2図参照) & EP, 629700, A2 & CA, 2125449, A	1-2, 10-11

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09. 09. 97

国際調査報告の発送日

24.09.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

藤田 節

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

4B

9453

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>PY</u> A	WO, 96/30510, A (日本たばこ産業株式会社) 03. 10月. 1996 (03. 10. 96) (請求項1, 第1、2図参照) & EP, 769553, A1 & AU, 9651207, A	<u>4-5, 13-14</u> 7, 9, 16, 18
<u>Y</u> A	JP, 03-103182, A (三菱化成株式会社) 30. 4月. 1991 (30. 04. 91) (特許請求の範囲参照) (ファミリーなし)	<u>6, 15</u> 7, 16
<u>Y</u> A	Plant Molecular Biology, Vol. 18(1992) A.H.Christensen et al. [Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation] p.675-689 (第681頁参照)	<u>8, 17, 19-22</u> 9, 18